

## 多様な分化制御転写因子 Mitf の役割

*The role of microphthalmia-associated transcription factor (Mitf), a tissue-specific transcription factor, which acts as a master regulator of diverse cell differentiation*

村上 賢, 舟場正幸

麻布大学獣医学部

Masaru Murakami, Masayuki Funaba

Azabu University School of Veterinary Medicine

**Abstract:** Microphthalmia-associated transcription factor (Mitf), a member of the basic helix-loop-helix leucine zipper (bHLH-ZIP) transcription factors, is required for proper development of several cell lineages including osteoclasts, melanocytes, retinal pigment cells and mast cells. Mitf has been implicated to be a key regulator of the later steps of osteoclastogenesis, but the role of Mitf is not fully elucidated; although nine distinct *Mitf* isoforms, which contain an isoform-specific first exon and are identical exons 2 to 9, have been identified at the RNA level, it is unclear whether any isoforms are unique to the osteoclast lineage cells. Treatment of RAW264 macrophage-like cells with sRANKL (100 ng/ml) for 72 h resulted in the increase in the number of Trap-positive multinucleated cells. The present study examined expression of *Mitf* isoforms in sRANKL-induced osteoclast-like cells. The s-RANKL treatment induced robust expression of *Mitf-E* gene. In addition, *Tfe3*, another member of the bHLH-ZIP family, was also significantly expressed throughout the differentiation of RAW264 cells. E isoform of Mitfs may be involved in the regulation of the late process in osteoclast development. Previous studies have revealed that tartrate-resistant acid phosphatase (*Trap*) is a transcriptional target of Mitf in osteoclasts. Thus, we also examined factors affecting *Trap* gene transcription in HepG2 cells that are responsive to Mitf overexpression. Transcriptional activation assays using luciferase-based reporter gene containing *Trap* promoter (-2049 - +1) revealed that overexpression of Mitf-J/-D/-E but not Mitf-A slightly increased luciferase expression. The overexpression of c-Jun but not c-Fos and JunB increased expression of *Trap* reporter gene, and synergistic effects of c-Jun and Mitfs (-A and -J/-D/-E) on *Trap* gene transcription were detected. In contrast, no synergism was observed between Mitf and the other AP-1 component (c-Fos and JunB). Distinct expression of *Mitf* isoforms and functional interaction between Mitf and the other transcription factor such as c-Jun during the terminal differentiation of osteoclasts suggests discrete regulation of osteoclastogenesis.

### 1. 目 的

Mitf (microphthalmia-associated transcription factor; 小眼球症関連転写因子) は、小眼球症、大理石骨病と色素細胞の欠失を特徴とする *mi/mi* マウスの変異遺伝子として同定された塩基性ヘリックス・

ループ・ヘリックス-ロイシンジッパー (bHLH-LZ) 領域をもつ転写因子である [1]。この転写因子は、マスト細胞、破骨細胞、色素細胞や心筋細胞で組織特異的に発現しており、これらの細胞の分化や成熟に深く関わっている。Mitf にはエクソン 1 の選択的スプライシングにより N 末端領域のみが異なる少な

くとも9種類のアイソフォーム (Mitf-A, -B, -C, -D, -E, -H, -J, -M, -mc) がある。また, Mitf-A, -H, -M 及び -E, -J, -mc ではエクソン 6a (18塩基対) の選択的スプライシングによる6アミノ酸残基の挿入/欠失を伴う2種類の変異体の存在が知られている [2-5]。しかし, Mitf アイソフォームや変異体による遺伝子発現制御やそれらの機能については, まだよくわかっていない。

破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化には破骨細胞分化因子である RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) が必須であり [6], RANKL を介した細胞内のシグナル伝達によって Mitf や NFAT (nuclear factor of activated T cell) c1, PU.1 といった多くの転写因子が活性化し, これらの転写因子が破骨細胞分化に重要な遺伝子発現を促進することがわかっている [7-9]。これらの転写因子の中で Mitf は RANKL 刺激によって破骨細胞分化マーカー遺伝子である TRAP (tartrate resistant acid phosphatase), カテプシン K, OSCAR (osteoclast-associated receptor) 等の発現を調節することが知られている。Mitf は破骨細胞分化に重要な役割を果たすことがわかっているが, Mitf アイソフォームと破骨細胞分化の関連性についてはよくわかっていない。Mitf に変異をもつマウスは破骨細胞異常による大理石骨病を呈する。ヒトでは Mitf 遺伝子に変異がおこると, 聴覚異常や毛髪・皮膚の色素欠失等の症状を示すワーデンブルグ症候群やティッツ症候群といった先天的疾病となる。また破骨細胞の骨吸収能の異常な亢進によっておこる骨粗鬆症や関節リウマチのような病態は近年, 増加の一途をたどっている。Mitf などの制御因子による破骨細胞の分化調節機構の解明は, これら疾病の機序の解明や新たな治療法への発展の一助となるかもしれない。本研究では, Mitf の破骨細胞分化における役割に注目し, 破骨細胞前駆細胞である RAW264 を用い, RANKL 刺激による破骨細胞分化における各 Mitf アイソフォームの遺伝子発現様態や機能の解析を行った。

## 2. 方 法

細胞培養, RNA 抽出, RT-PCR, PCR-RFLP, ルシフェラーゼレポーターアッセイについては文献 [5] に示した方法を用いた。

## 3. 結果と考察

### 3-1 RANKL 刺激による RAW264 の破骨細胞様細胞の形成

100 ng/mL の RANKL で RAW264 細胞を3日間刺激したところ, 多核化した巨大な細胞が形成された。この細胞に TRAP 染色を行ったところ, 核と細胞質が紫〜赤紫色に染まり TRAP 陽性の破骨細胞様細胞であった。

### 3-2 破骨細胞分化マーカー遺伝子と各 Mitf アイソフォームの発現

RAW264 に RANKL 刺激を加え多核・巨細胞化した細胞から RNA を抽出し RT-PCR を行なった。破骨細胞分化マーカー遺伝子である カテプシン K, OSCAR, TRAP, CTR (calcitonin receptor) は破骨細胞様細胞において有意な発現が確認できた。分化マーカー遺伝子の1つである  $\beta_3$  インテグリンは RANKL 未刺激の RAW264 で既に発現していた。また, リアルタイム PCR による定量解析を行ったところ, TRAP と カテプシン K は, 破骨細胞様細胞でそれぞれ 750 倍と 90 倍の発現量の上昇がみられた。

破骨細胞様細胞の各 Mitf アイソフォームの発現を RT-PCR によって調べたところ, Mitf-A と -J の発現は RANKL 刺激の有無に関係なく見られたが, Mitf-E は RANKL 刺激により得られた破骨細胞様細胞に特異的に発現していることがわかった。その他の転写因子 NFATc1 と PU.1 は RANKL 未刺激の RAW264 と破骨細胞様細胞の両方で発現が確認できた。また, リアルタイム PCR による定量解析を行ったところ, RANKL 未刺激の RAW264 と破骨細胞様細胞の間で, common Mitf と Mitf-A で変化はみられなかった。

次に, 発現の見られた Mitf-A, -J, -E, common Mitf について PCR-RFLP 法とバイオアナライザを用いて, RAW264 と破骨細胞様細胞の2つの変異体の存在 (6ab と 6b タイプ) とそれらの変異体の発現量比を測定した。Mitf-A の2つの変異体の発現量比 (6ab:6b) は未刺激 RAW264 で 1.60, 破骨細胞様細胞で 1.85 であった。Mitf-J での 6ab:6b の発現量比はそれぞれの細胞で 1.52 と 2.10 であった。破骨細胞様細胞のみに発現がみられた Mitf-E の 6ab:6b の発現量比は 1.89 であった。これらのことから破骨細胞様細胞

の分化において、Mitf-E の 6ab と 6b タイプの両変異体が発現しており、また Mitf-A と -J の発現は全体量だけでなく 2 つの変異体の発現量比においても有意な差はみられないことがわかった。

### 3-3 ルシフェラーゼレポーターアッセイによる Mitf アイソフォームの転写活性

HepG2 細胞にそれぞれの Mitf アイソフォームを過剰発現させ、TRAP, OSCAR, E-cadherin 遺伝子のプロモーター領域を用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。また、転写因子 AP-1 の共発現による影響も調べた。TRAP-luc レポーターにおいて、Mitf-J/D/E はわずかに転写活性を増加させた。また、AP-1 の構成成分の一つである c-jun は単独で転写活性を上昇させ、さらに Mitf との共発現では相乗的効果を示した。c-fos や junB ではそのような効果は認められなかった。OSCAR-luc 及び E-cadherin-luc レポーターでは、Mitf-A や Mitf-J/D/E による有意な転写活性の変化はみられなかった。

なお、本研究の派生及び関連研究として、文献 [10] と [11] に報告した。

### 要 約

小眼球症関連転写因子 (Mitf) は塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス-ロイシンジッパー (bHLH-LZ) 構造を持つ組織特異的転写因子であり、破骨細胞、マスト細胞、神経堤由来メラノサイト、網膜色素上皮細胞などの分化制御因子である。Mitf には、N 末領域のみの配列が異なる少なくとも 9 種類のアイソフォーム (Mitf-A, -B, -C, -D, -E, -H, -J, -M, -mc) と、さらにエクソン 6a の選択的スプライシングによる変異体 (6ab と 6b) が存在することが知られている。本研究では、RAW264 細胞を用いて、RANKL 刺激による破骨細胞様細胞への分化における Mitf の各アイソフォームと変異体の遺伝子発現お

よび破骨細胞分化マーカー遺伝子の発現を RT-PCR, リアルタイム PCR, PCR-RFLP 法により調べた。その結果、RANKL 刺激により Mitf-E の特徴的な遺伝子発現が認められた。また、RANKL 刺激により TRAP, カテプシン K, OSCAR, CTR の破骨細胞分化マーカー遺伝子が発現することを確認した。次に、分化マーカー遺伝子の各制御領域をもつルシフェラーゼレポーターを用いて、各 Mitf アイソフォームの転写活性機能を比較したところ、TRAP レポーターに対して Mitf-J/D/E がわずかに転写活性を上昇させ、さらに c-jun の共発現が相乗的効果を示すことがわかった。破骨細胞分化の後期過程において Mitf アイソフォームの特徴的な発現及び Mitf とその他の転写因子との機能的相互作用が破骨細胞分化を制御しているのかもしれない。

### 文 献

- 1) Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A et al., Cell, 74: 395-404, 1993.
- 2) Steingrímsson E, Moore KJ, Lamoreux ML et al., Nat Genet, 8: 256-263, 1994.
- 3) Yasumoto K, Amae S, Udonon T et al., Pigment Cell Res, 11: 329-336, 1998.
- 4) Hallsson JH, Favor J, Hodgkinson C et al., Genetics, 155: 291-300, 2000.
- 5) Murakami M, Iwata Y, Funaba M, Mol Cell Biochem, 303: 251-257, 2007.
- 6) Lacey DL, Timms E, Tan HL et al., Cell, 93(2): 165-176, 1998.
- 7) Takayanagi H, Kim S, Koga T et al., Dev Cell, 3(6): 889-901, 2002.
- 8) So H, Rho J, Jeong D et al., J Biol Chem, 278(26): 24209-24216, 2003.
- 9) Sharma SM, Bronisz A, Hu R et al., J Biol Chem, 282(21): 15921-15929, 2007.
- 10) Murakami M, Kondo S, Funaba M, Cell Biol. Int, 37(7): 848-854, 2008.
- 11) Nakaya K, Murakami M, Funaba M, J. Cell. Biochem, 105(3): 801-813, 2008.